

黄连素对肝癌细胞生长的影响以及机理

吴 刚 刘志苏 钱 群 江从庆
武汉大学中南医院普通外科 湖北 武汉 430071

摘要 目的:观察黄连素对肝癌细胞株 3B 生长的影响,并且探讨其作用的机理。为阐明黄连素作为一种新的治疗肝癌的药物提供理论依据以及实验室的结果。方法:应用不同浓度的黄连素作用于肝癌细胞后,通过免疫组化 SP 法检测细胞膜表面的 Caspase-3 蛋白的表达,用流式细胞仪和荧光显微镜观察癌细胞凋亡的情况,并应用 RT-PCR 法检测 Caspase-3 mRNA 的含量。结果:黄连素对肝癌细胞株 3B 的生长有明显抑制作用,并有浓度依赖性。在时间相同内,药物处理组的 Caspase-3 蛋白和 mRNA 的表达与空白对照组相比较均有显著性差异 ($P < 0.01$);流式细胞仪分析存在 G₂/M 阻滞,在 G₁ 峰前有明显的凋亡峰;荧光显微镜观察显示细胞形态发生凋亡特征性的改变:细胞膜完整,染色质浓缩,核碎裂,凋亡小体的形成。结论:黄连素能够有效地抑制肝癌细胞的生长,其机理是诱导细胞凋亡;而凋亡的机制可能是通过 Caspase-3 起作用。

关键词 黄连素;肝细胞癌;半胱氨酸蛋白酶-3;凋亡

中图分类号 R735.9 **文献标识码** A **文章编号** 1671-8852(2008)01-0102-04

Effects of Berberine on the Growth of Hepatocellular Carcinoma Cell lines

WU Gang, LIU Zhisu, QIAN Qun, JIANG Congqing

Dept. of General Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Abstract

Objective: To investigate the effect on growth of hepatoma cell line 3B by berberine and the mechanism. **Methods:** After being treated with different concentrations of berberine, the Caspase-3 lever of mRNA and protein in HCC cell line were detected by immunohistochemistry method and RT-PCR method respectively; flow cytometry and fluorescent microscopy were used to observe apoptosis of Hepatocellular carcinoma cell line. **Results:** Berberine could inhibit the growth of HCC line 3B obviously in a dose-dependent manner. At the same time, the expressions of Caspase-3 protein and mRNA in the every treated group were higher than in the blank control group ($P < 0.01$). They were obvious differences between them. Flow cytometry assay showed an arrestment at G₂/M phase and sub-G₁ cell peak; hepatocellular carcinoma cell cultured with different concentrations of berberine presented apoptosis features under fluorescent microscopy, such as intact cell membrane, chromatin condensation, nucleic fragmentation and apoptotic body formation. **Conclusion:** Berberine can obviously inhibit the growth of hepatocellular cell line 3B through inducing hepatoma cell. The activation and increase of Caspase-3 is the possible mechanism of apoptosis.

Key Words Berberine; Hepatocellular Carcinoma; Caspase-3; Apoptosis

作者简介: 吴刚,男,1980-,医学硕士生,主要从事肝胆外科疾病的研究
通信作者: 刘志苏,男,1953-,教授,博士生导师,主要从事肝胆外科的研究

黄连素是一种古老的消化系统用药,以前主要用于肠道炎症伴发热,在中国和印度作为消化道疾病用药已有 3000 余年的历史^[1]。然而随着对它在临床上研究深入,不断发现它在其他疾病治疗方面的应用。因此本文就是探讨黄连素对肝癌细胞生长的影响及其作用机理。

1 材料与方 法

1.1 材料 人肝癌细胞系 3B,由武汉大学医学院病毒所提供;小鼠抗人 Caspase-3 单克隆体、Trizol 试剂、Taq 酶、Rnase 酶、碘化丙啶(PI)、蛋白酶 K 以及 Hoeches33258 购于碧云天试剂公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清、链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)试剂盒和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购于晶美公司;Caspase-3 引物和 GAPDH(内参照)引物由三博公司合成;黄连素购买于陕西宝鸡市永嘉天然植物开发有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养及分组 人肝癌细胞株 3B 在含有 10% 灭活胎牛血清以及 1% 双抗的培养基培养至指数增生期时,制成细胞悬液,按浓度 5×10^4 3 孔接种于 48 孔板,待细胞完全贴壁后换为新鲜配制的含有不同药物浓度的培养基。实验分组: 对照组(未加任何物); 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组; 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组; 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组; 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组。每组设 5 个复孔。在 12, 24, 48, 72 h 分别测量相关数据。

1.2.2 免疫组织化学检测 Caspase-3 蛋白 72 h 后细胞爬片,SP 法检测 Caspase-3 表达,结果判定标准:每组设阳性对照(黄连素处理组)和阴性对照[磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗],胞质有黄色颗粒着色为阳性。结果判断:细胞染成黄色为 Caspase-3 阳性,依染色深浅分为: - (未染色)、+ (弱)、# (中)、## (强), 计分值为: 0(-)、1(+)、2(#)、3(##)。每份样本计数 200 个细胞,算出各个染色细胞的累积分计;各组样本 5 份,所有积分数值直接输入软件进行统计分析。

1.2.3 流式细胞仪检测 常规消化不同浓度作用 72 h 的细胞后,收集离心后的细胞,PBS 洗涤后重悬细胞,调密度 $1 \times 10^9/\text{L}$,加入 70% 预冷乙醇固定。4 量过夜后再加 1 g/L RNA 酶以及 0.1 g/L 碘化丙啶(PI),4 避光染色 30 min 后于流式细胞仪上测试。

1.2.4 荧光显微镜观察 收集经不同浓度处理后 72 h 的细胞,离心后加 PBS 缓冲液洗涤并悬浮细

胞;取一滴悬液于盖玻片上吹散,加 3:1 甲醇/冰醋酸固定液固定 10 min,自然晾干后加入 5 mg/L 荧光染料 Hoechst33258 避光染色 45 min 后用双蒸水洗 3 次,自然晾干;将盖玻片上有细胞的一面封盖在预滴封片液的载玻片上,置 BH-2 荧光显微镜下观察并摄像。

1.2.5 逆转录-PCR 检测 Caspase-3 mRNA:反应体系按试剂说明书进行,Caspase-3 引物序列如下:上游引物 5-ATGGACAACAACGAAACCTCCGTG3;下游引物 5-CCACTCCCA GTCA TTCC TTTA GTG3,反应产物为 857 bp;使用 GAPDH 为内参照,引物序列如下:上游引物 5-CACCATCTTCCA GGA GCGA G3,下游引物 5-TCACGCCACA GTT TCCC GGA-3,反应产物为 372 bp。二者均由生物公司合成。首先应用 Trizol 试剂,根据试剂盒说明书提取组织的 RNA,并应用 DNA 酶处理 DNA;取 5 μg RNA 加入 Oligo(dT) 1 μl 和 Random Hemmers 1 μl ,按照对应试剂盒说明书进行操作,合成 cDNA;然后应用 RNase 灭活 RNA;应用 25 μl 反应体系进行 PCR 反应。于 94 预变性 3 min,94 15 s,60 30 s,72 45 s,共 25 个循环后,于 72 延伸 5 min。取扩增产物 10 μl ,1% 琼脂糖凝胶(含 0.1 ml 溴化乙啶)电泳,80 V、45 min,凝胶成像分析系统行半定量分析,用 Caspase-3/GAPDH 表示 Caspase-3 的相对表达水平。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件对相关数据进行检验:计量资料用 t 检验,计数资料用 χ^2 检验,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.01$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 Caspase-3 细胞免疫细胞组织化学染色结果

肝癌细胞质可见黄色颗粒。阳性者弥漫性分布在胞质内,阴性对照为淡蓝色。黄连素作用后肝癌细胞 Caspase-3 蛋白积分值与浓度呈明显的正相关。浓度为分别为 50.0,10.0,5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组的分值分别是 348.3 ± 5.4 、 236.8 ± 12.9 、 124.5 ± 7.1 ,相对于阴性对照组(48.3 ± 9.5)有明显差异($n = 5$, $P < 0.01$)。

2.2 流式细胞仪检测分析结果 流式细胞仪分析存在 G_2/M 阻滞,在 G_1 峰前有明显的凋亡峰,随着浓度的升高,凋亡峰也随之增强(见图 1)。

2.3 荧光显微镜观察结果 对照组细胞胞膜比较完整,胞质较均匀;处理组细胞胞膜皱缩不光滑,细

胞质分布不均匀,核浓缩并碎裂为多个大小不等、形状不规则的小体,此为凋亡小体(见图 2)。

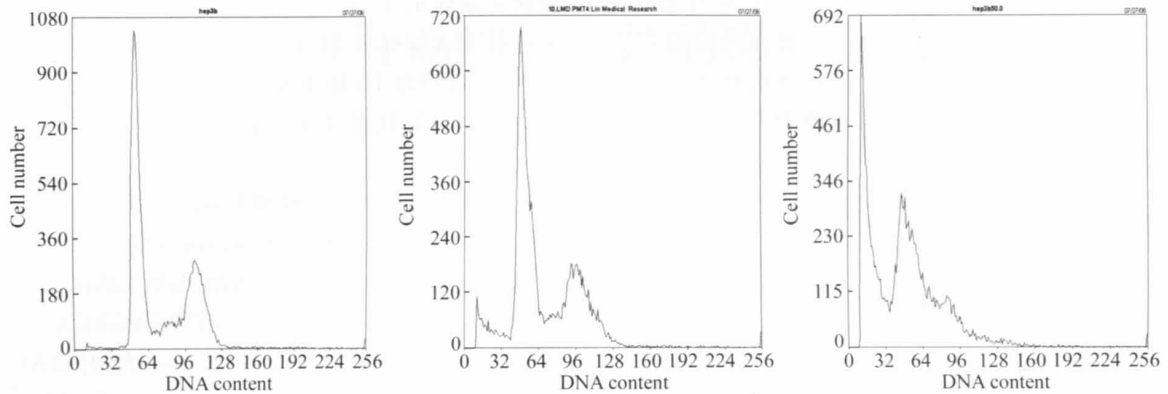


图 1 流式细胞仪检测 Hep3B 凋亡

Fig. 1 cell apoptosis assessed by flow cytometry

1A. Control group; 1B. 5.0 $\mu\text{mol/L}$ group; 1C. 50.0 $\mu\text{mol/L}$ group

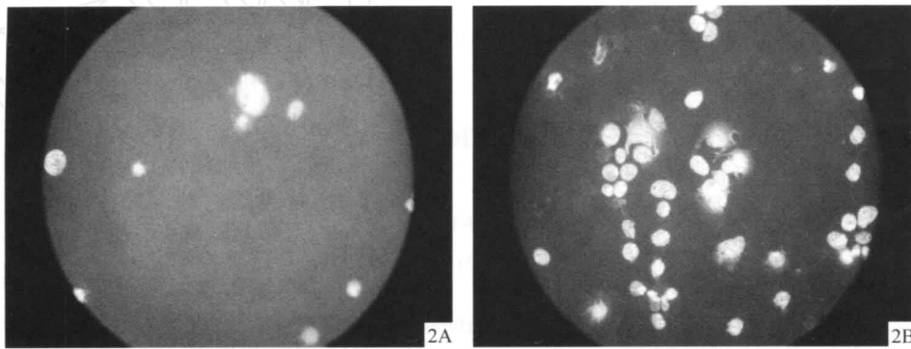


图 2 荧光显微镜观察细胞形态($\times 400$)

Fig. 2 Cell morphology by cytochemical staining

2A. control group; 2B. 50.0 $\mu\text{mol/L}$ group

2.4 RT-PCR的结果 以 Caspase-3/ GAPDH 的灰度值作为其半定量指标,浓度不同黄连素在不同时间作用于癌细胞后的灰度值如表 1,同一浓度黄连素不同时间对癌细胞 Caspase-3 mRNA 表达影响的差

异有显著性($P < 0.01$);随着作用时间的推移,肝细胞癌 Caspase-3 mRNA 表达水平逐渐上升,不同浓度的黄连素对癌细胞 Caspase-3 mRNA 表达水平的差异亦有显著性($P < 0.01$) (见图 3)。

表 1 不同浓度黄连素作用不同时间对肝癌 3B 细胞 Caspase-3 mRNA 表达

Tab. 1 Expression of Caspase-3 protein and mRNA under different concentrations of berberine in different periods

Group	Dose of berberine ($\mu\text{mol/L}$)	n	Ratio of Caspase-3 mRNA/ GAPDH($\bar{x} \pm s$)			
			12 h	24 h	48 h	72 h
1	0	5	0.76 \pm 0.03	0.78 \pm 0.08	0.79 \pm 0.02	0.81 \pm 0.01
2	0.5	5	0.61 \pm 0.05	0.63 \pm 0.09	0.69 \pm 0.08	0.76 \pm 0.03
3	5	5	0.50 \pm 0.02	0.56 \pm 0.01	0.59 \pm 0.08	0.68 \pm 0.04
4	10	5	0.43 \pm 0.06	0.48 \pm 0.01	0.51 \pm 0.07	0.59 \pm 0.03
5	50	5	0.32 \pm 0.02	0.36 \pm 0.01	0.47 \pm 0.09	0.52 \pm 0.04

$P < 0.01$, vs control group

3 讨论

黄连素^[2] (berberine) 又叫盐酸小檗碱,是从黄

连、黄柏、三棵针等毛茛科黄连(*coptis chinese*) 植物根状茎中提取的生物碱,也可以用人工方法合成。国外已经有研究证实表明黄连素对结肠肿瘤^[3]、肺癌^[4]、白血病^[5]、食管癌^[6]、膀胱癌^[7] 的治疗有较好

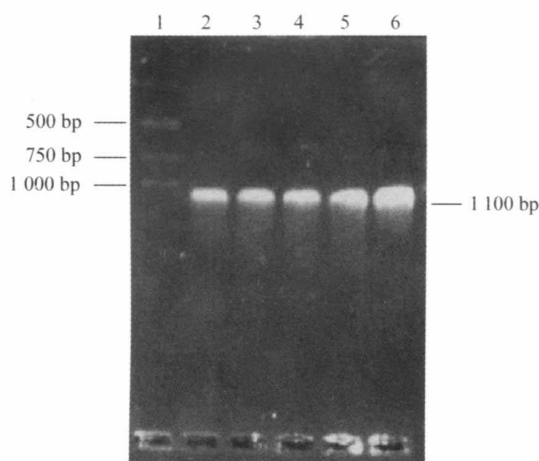


图 3 RT-PCR 检测 Caspase-3 基因 mRNA 的表达情况

Fig. 3 Expression of Caspase-3 mRNA by RT-PCR

1:marker,2-6:0,0.5,5,10,50 μ mol/L berberine group

作用,然而其作用机制不尽相同。本实验通过观察不同浓度的黄连素处理肝癌细胞不同时间后细胞生长形态的改变,发现其对肝癌细胞亦有明显的效果。

Caspase-3 是细胞凋亡诱导途径中一个非常重要的蛋白酶,肿瘤坏死因子启动细胞内凋亡程序,最终要激活 Caspase 级联反应从而诱导细胞凋亡,而目前认为 Caspase-3 在此凋亡信号传递过程中起非常关键作用。本实验发现黄连素对肝癌细胞的作用呈明显时间和剂量的依赖性。我们发现较低浓度(0.5 μ mol/L)的药物即对肝癌细胞有明显的抑制作用,并且可使癌细胞发生凋亡。流式细胞仪的检测结果显示:黄连素处理过的肝癌细胞的 S 期比例大大减少,高剂量的药物浓度(50 μ mol/L)在 G₁ 峰前有明显的凋亡峰。这说明黄连素对肝癌细胞增殖分裂具有明显的抑制作用,并且还可以通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥作用,荧光显微镜观察的结果也从细胞形态学角度进一步证实黄连素能够诱导肝癌细胞凋

亡的作用。

在我们的实验中,用药物处理过的肝癌细胞所表达的 Caspase-3 蛋白和 Caspase-3 mRNA 半定量表达水平随药物浓度增加有明显提高,与阴性对照存在着显著的差异,说明黄连素通过诱导激活 Caspase-3 蛋白来实现对肝癌细胞的凋亡作用。

参考文献

- [1] 台卫平,罗和生. 黄连素与肿瘤关系研究进展[J]. 国外医学·肿瘤学分册,2002,29(6):423-425.
- [2] 刘朝江. 黄连素的临床应用进展[J]. 中国医院药学杂志,2005,25(3):272-273.
- [3] Li XK, Motwani M, Tong W, et al. Huanglian, A chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclinB1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells[J]. Mol Pharmacol, 2000, 58(6):1 287-1 293.
- [4] Mitani N, Murakami K, Yamaura T, et al. Inhibitory effect of berberine on the mediastinal lymph node metastasis produced by or 2 thotopic implantation of Lewis lung carcinoma[J]. Cancer Lett, 2001, 165(1):35-42.
- [5] Chung J G, Chen GW, Hung CF, et al. Effects of berberine on arylamine N-acetyltransferase activity and 2-aminofluorene-DNA adduct formation in human leukemia cells[J]. Am J Chin Med, 2000,28(2):227-238.
- [6] Iizuka N, Miyamoto K, Hazama S, et al. Anticachectic effects of Coptidis rhizoma, an anti-inflammatory herb, on esophageal cancer cells that produce interleukin 6 [J]. Cancer Lett, 2000, 158(1):35-41.
- [7] Chung J G, Wu L T, Chu CB, et al. Effects of berberine on arylamine N-acetyltransferase activity in human bladder tumour cells[J]. Food Chem Toxicol, 1999, 37(4):319-326.

(2007-03-29 收稿)

编辑 孙孝云